

REC'D 14 JAN 2000

PCT/JP99/06472

4 日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.11.99

JP99/0472

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年11月20日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第347813号

出願人

Applicant (s):

扶桑薬品工業株式会社

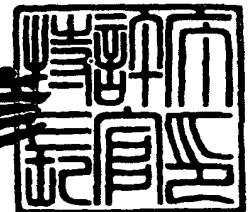
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3089685

【書類名】 特許願

【整理番号】 163445

【提出日】 平成10年11月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00
C07K 14/435
C07K 7/00
C12N 15/00
C12N 15/11
C12N 15/63
A61K 48/00
C12N 9/00
G01N 33/48

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼBSSP4

【請求項の数】 75

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133

【氏名】 植村 英俊

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ睦603号

【氏名】 奥井 文

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府阪南市自然田786-2

【氏名】 小南 勝也

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町2
85-79

【氏名】 山口 希

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ B S S P 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 のアミノ酸番号 1～268 に示すアミノ酸 268 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 1～268 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 2】 配列番号 1 の塩基番号 151～954 に示す塩基配列、配列番号 2 のアミノ酸番号 1～268 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 1～268 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 3】 配列番号 4 のアミノ酸番号 1～270 に示すアミノ酸 270 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 4 のアミノ酸番号 1～270 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸番号 1～270 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 4】 配列番号 3 の塩基番号 151～960 に示す塩基配列、配列番号 4 のアミノ酸番号 1～270 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 4 のアミノ酸番号 1～270 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 5】 配列番号 6 のアミノ酸番号 1～257 に示すアミノ酸 257 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 6 のアミノ酸番号 1～257 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 6 のアミノ酸番号 1

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス
202号

【氏名】 三井 真一

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中心区道修町1丁目7番10号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証（写） 2

【包括委任状番号】 9700672

【プルーフの要否】 要

配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項17】 配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸253個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項18】 配列番号17の塩基番号151～909に示す塩基配列、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項19】 配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸34個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

【請求項20】 配列番号1の塩基番号4～105に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

【請求項21】 配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸15個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸

番号-15~-1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

【請求項22】 配列番号1の塩基番号106~150に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

【請求項23】 配列番号20のアミノ酸番号1~259に示すアミノ酸259個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号1~259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号1~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項24】 配列番号19の塩基番号227~1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号1~259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号1~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項25】 配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示すアミノ酸34個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

【請求項26】 配列番号19の塩基番号80~181に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示すアミノ酸配列をコードする塩基

【請求項11】 配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸82個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項12】 配列番号11の塩基番号151～396に示す塩基配列、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項13】 配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸185個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項14】 配列番号13の塩基番号151～705に示す塩基配列、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項15】 配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸80個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項16】 配列番号15の塩基番号151～390に示す塩基配列、

～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項6】 配列番号5の塩基番号151～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項7】 配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸97個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項8】 配列番号7の塩基番号151～441に示す塩基配列、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項9】 配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸158個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項10】 配列番号9の塩基番号151～624に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

【請求項27】 配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸15個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

【請求項28】 配列番号19の塩基番号182~226に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

【請求項29】 配列番号2のアミノ酸番号-49~268に示すアミノ酸317個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-49~268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49~268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項30】 配列番号1の塩基番号4~954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-49~268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49~268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項31】 配列番号2のアミノ酸番号-15~268に示すアミノ酸283個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミ

ノ酸番号-15~268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15~268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項32】 配列番号1の塩基番号106~954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-15~268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15~268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項33】 配列番号4のアミノ酸番号-49~270に示すアミノ酸319個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号-49~270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号-49~270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項34】 配列番号3の塩基番号4~960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-49~270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-49~270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項35】 配列番号4のアミノ酸番号-15~270に示すアミノ酸285個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号-15~270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号-15~270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項36】 配列番号3の塩基番号106~960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-15~270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリ

ダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-15~270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項37】 配列番号6のアミノ酸番号-49~257に示すアミノ酸306個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号-49~257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号-49~257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項38】 配列番号5の塩基番号4~921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号-49~257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号-49~257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項39】 配列番号6のアミノ酸番号-15~257に示すアミノ酸272個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号-15~257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号-15~257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項40】 配列番号5の塩基番号106~921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号-15~257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号-15~257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項41】 配列番号20のアミノ酸番号-49~259に示すアミノ酸308個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-49~259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の

性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 4 2】 配列番号 19 の塩基番号 80～1003 に示す塩基配列、配列番号 20 のアミノ酸番号-49～259 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 20 のアミノ酸番号-49～259 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 4 3】 配列番号 20 のアミノ酸番号-15～259 に示すアミノ酸 274 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 20 のアミノ酸番号-15～259 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 20 のアミノ酸番号-15～259 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 4 4】 配列番号 19 の塩基番号 182～1003 に示す塩基配列、配列番号 20 のアミノ酸番号-15～259 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 20 のアミノ酸番号-15～259 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 4 5】 配列番号 1 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 4 6】 配列番号 3 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 3 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 4 7】 配列番号 5 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 5 に示す塩

基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 48】 配列番号 7 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 7 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 49】 配列番号 9 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 9 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 50】 配列番号 11 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 11 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 51】 配列番号 13 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 13 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 52】 配列番号 15 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 15 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 53】 配列番号 17 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 17 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 54】 配列番号 19 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 19 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

る塩基配列。

【請求項55】 請求項2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項56】 請求項2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項57】 請求項2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、30、32、34、36、38、40、45～53のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP4を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

【請求項58】 請求項24、26、28、42、44または54記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP4を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

【請求項59】 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項57または58のいずれか1つに記載の製造法。

【請求項60】 BSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項61】 BSSP4遺伝子がBSSP4コードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項62】 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項63】 mBSSP4遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

【請求項64】 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

【請求項65】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項64記載の抗体。

【請求項66】 ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項67】 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体と、検体中の該タンパク質もしくはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。

【請求項68】 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中のhBSSP4もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

【請求項69】 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化hBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化hBSSP4の量から検体中のhBSSP4もしくはその断片の量を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

【請求項 70】 検体が体液である、請求項 67～69 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 71】 請求項 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41 または 43 のいずれか 1 つに記載のタンパク質を含む、組織における、疾患の診断マーカー。

【請求項 72】 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項 71 記載のマーカー。

【請求項 73】 脳、前立腺、胎盤、精巣または骨格筋における、癌、炎症の診断に用いる請求項 71 記載のマーカー。

【請求項 74】 精子および精巣における不妊症の診断に用いる請求項 71 記載のマーカー。

【請求項 75】 前立腺における前立腺肥大症の診断に用いる請求項 71 記載のマーカー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「hBSSP4」および「mBSSP4」と称し、両者を区別しない場合は単に「BSSP4」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種ならびにそれらの検出に関する。さらには、hBSSP4 および mBSSP4 タンパク質ならびに hBSSP4 および mBSSP4 ポリヌクレオチドおよびタンパク質の組成物、それらの製造方法および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。

プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

【0003】

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に關与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に關連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体（プロ体）のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、この様なタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

【0004】

例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

【0005】

最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ

酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997)、Gschwendら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997)、Chenら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

特開平 9-149790 号の配列番号 3 には新規セリンプロテアーゼ (Neurosin) が開示されており、また Neurosin は Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997 にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いて Neurosin を大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

このような状況の中、我々はヒトおよびマウス新規セリンプロテアーゼのクローニングに成功した。ヒト新規セリンプロテアーゼ (hBSSP4) は mRNA のオルターナティブスプライシングにより 9 種のタンパク質から成っていた。以下に示す配列表の塩基配列中における「n」記号は、通常の核酸塩基、アデニン (a)、シトシン (c)、グアニン (g)、チミン (t) のいずれかがその位置にあることを、アミノ酸配列中における「Xaa」は、20 種の天然に存在するいずれかのアミノ酸がポリペプチド配列その位置にあることを意味する。

配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質はヒト型タンパク質 (hBSSP4) であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号 1 ~ 268 で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号 39 ~ 42 に示す Ala-Ala-His-Cys およびアミノ酸番号 192 ~ 196 に示す Asp-Ser-Gly-Gly-Pro を有し、かつ、それらのコンセンサス配列間に Asp が 1 カ所以上存在していた。このタンパク質をコードする塩基配列を配列番号 1 に示した。

【0007】

配列番号 4 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質はヒト型タンパク質 (h

BSSP4) であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号1～270で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミノ酸番号192～196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。このタンパク質をコードする配列番号3に示した塩基配列は配列番号1に示した塩基番号943～1217が除去され、配列番号4に示したアミノ酸配列は配列番号2に示したアミノ酸配列とアミノ酸番号265以降が異なったものである。また、配列番号3の塩基番号885～887の「nnc」が、「tac」または「atc」であり、これがコードする配列番号4のアミノ酸番号239の「Xaa」が、チロシン(Tyr)またはイソロイシン(Ile)である可能性が考えられる。

【0008】

配列番号6に示したアミノ酸配列はヒト型タンパク質(hBSSP4)であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号1～257で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミノ酸番号192～196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。このタンパク質をコードする配列番号5に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号895～1208が除去され、配列番号6に示したアミノ酸配列は配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号249以降が異なったものであり、さらに、配列番号1に示した塩基番号1282の下流に配列番号5の塩基番号969～1036を付加したものである。また、配列番号5の塩基番号907～909の「nccg」が、「ccg」または「gcg」であり、これがコードする配列番号6のアミノ酸番号253の「Xaa」が、プロリン(Pro)またはアラニン(Ala)である可能性が考えられる。

【0009】

配列番号8に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリン

プロテアーゼのコンセンサス配列は有していなかった。しかし、mRNAでの発現は確認されているので、何らかの役割を有しているものと考えられる。配列番号7に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号233～282が除去されたものである。

【0010】

配列番号10に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、Ala-Ala-His-Cysは有していなかったが、アミノ酸番号82～86に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proは有していた。配列番号9に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号233～562が除去されたものである。

【0011】

配列番号12に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号11に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号364～562が除去されたものである。

【0012】

配列番号14に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号13に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号588～1145が除去されたものである。なお、配列番号13に示す塩基番号652以降の塩基配列が「ccc ggg ccc cag cgc ttt tgt gta tat aaa tgt ta atgatttt tataggtatt tgtaaccctg cccacatatc」であり、配列番号14に示すアミノ酸番号168以降のアミノ酸配列が「Pro Gly Pro Gln Arg Phe Cys Val Tyr Lys Cys」である可能性もある。

【0013】

配列番号16に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla

a-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号15に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号285～562が除去されたものである。

【0014】

配列番号18に示したアミノ酸配列はヒト型タンパク質(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号17に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号720の下流に配列番号17の塩基番号721～948を付加したものであり、配列番号1の塩基番号721以降が除去されたものである。

【0015】

配列番号20に示したアミノ酸配列はマウス型タンパク質(mBSSP4)であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号1～259で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミノ酸番号192～196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。このタンパク質をコードする塩基配列を配列番号19に示した。

【0016】

ノザン・プロット解析の場合、hBSSP4は小脳および前立腺で発現を示し、mBSSP4は前立腺および骨格筋で発現が認められた。RT-PCR解析の場合においては、hBSSP4は胎児から成人の脳、胎盤および前立腺で発現が認められ、mBSSP4は生後12日目の脳および胎盤で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、胎盤および骨格筋において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病(AD)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。

【0017】

A Dの臨床診断は今日、DSM-III RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（Mckhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-IVの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

【0018】

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

【0019】

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からA Dの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) A D治療薬の客観的な効果判定システム、2) A Dの診断基準を満たす以

前の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、 $A\beta$ およびその前駆体タンパク質である β APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

【0020】

本発明の新規セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

【0021】

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-PA) がある。U-PAはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する

不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素およびコラゲナーゼ等が知られている。

【0022】

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク (AFP) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タンパク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2 は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。

【0023】

ゆえに、本発明は、脳、前立腺、胎盤および骨格筋等の各種組織において、アルツハイマー病 (AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供する。

【0024】

【課題を解決するための手段】

本発明の一つの態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼhBSSP4およびmBSSP4アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号2のアミノ酸番号1～268に示す268個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号151～954）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（カルシウム付加体など）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

【0025】

さらに、配列番号4のアミノ酸番号1～270に示す270個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号151～960）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0026】

さらに、配列番号6のアミノ酸番号1～257に示す257個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号151～921）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0027】

さらに、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示す97個から成るアミノ酸配

列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 7、塩基番号 151～441）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0028】

さらに、配列番号 10 のアミノ酸番号 1～158 に示す 158 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 9、塩基番号 151～624）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0029】

さらに、配列番号 12 のアミノ酸番号 1～82 に示す 82 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 11、塩基番号 151～396）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0030】

さらに、配列番号 14 のアミノ酸番号 1～185 に示す 185 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 13、塩基番号 151～705）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0031】

さらに、配列番号 16 のアミノ酸番号 1～80 に示す 80 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 15、塩基番号 151～390）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0032】

さらに、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示す253個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号17、塩基番号151～909）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0033】

さらに、配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4～105）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

【0034】

さらに、配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号106～150）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

【0035】

また、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示す259個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号227～1003）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0036】

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80～181）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

【0037】

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号182~226）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

【0038】

本発明の別の態様は、配列番号2に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1~268）のN末端側に、配列番号2に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸317個もしくは283個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4~954もしくは塩基番号106~954）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0039】

本発明の別の態様は、配列番号4に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1~270）のN末端側に、配列番号4に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸319個もしくは285個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号4~960もしくは塩基番号106~960）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0040】

本発明の別の態様は、配列番号6に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1~257）のN末端側に、配列番号6に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸306個もしくは272個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸を

コードする塩基配列（配列番号5、塩基番号4～921もしくは塩基番号106～921）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0041】

本発明の別の態様は、配列番号20に示す成熟体mBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～259）のN末端側に、配列番号20に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸308個もしくは274個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80～1003もしくは塩基番号182～1003）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

また本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP4、hBSSP4、mBSSP4には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

【0042】

【発明の実施の形態】

本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法（Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979）等を用いることができる。全RNAからのポリ（A）+RNAの調製はオリゴ（dT）を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフ

イニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhBSSP4もしくはmBSSP4のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくはcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ(E. coli) RNase H、イー・コリ DNAポリメラーゼ1、イー・コリ DNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0043】

hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP4もしくはmBSSP4発現細胞ポリ(A)+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法(Mattencchi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981)等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

【0044】

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変し

たタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および／または挿入を含むと解する。特に、配列番号 2、4、6 または 20 に示す h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 成熟型タンパク質の N 末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

【0045】

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 または 20 のいずれかに記載のアミノ酸配列、さらに、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 または 19 に示した塩基配列によってコードされるアミノ酸配列またはこれらのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

【0046】

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Graham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, 43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる。

【0047】

さらに、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 または 19 のいずれかに記載の塩基配列を含む塩基配列またはこれらに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明による h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 と同等の性質を有する限りその DNA は本発明による DNA に含有される。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジ

エントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液（0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP）、0.5% SDSおよび20 μg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて0.1% SDS含有2×SSCで洗浄する条件である。SSCの代わりに適宜SSPEを使用してもよい。

【0048】

配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

【0049】

さらに、本発明が提供するhBSSP4もしくはmBSSP4のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5' 非翻訳領域、または3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

【0050】

本発明はまた、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19に示す塩基配列、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはそれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

【0051】

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/19、pFastBAC（GIBCO社製）等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばpSecTag2Aベクター、pSecTag2Bベクター（Invitrogen社）を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、Tag核酸配列、切断可能核酸配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター（本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付の特許出願明細書）を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、Tag塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする塩基配列（当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。）を用いることが好ましい。

【0052】

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞（微生物を含む）が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、High FiveTM（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

【0053】

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

【0054】

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP4もしくはmBSSP4を採取する、hBSSP4もしくは

mBSSP4の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

【0055】

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

【0056】

本発明は、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子とは、hBSSP4もしくはmBSSP4をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP4もしくはmBSSP4の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP4もしくはmBSSP4が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

【0057】

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0058】

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0059】

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリA

シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

【0060】

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

【0061】

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP4遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

【0062】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

【0063】

本発明はまた、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、5、6、18または20のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0064】

本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

【0065】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP4またはmBSSP4と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Method, 39, 285, 1980、Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981、Nature, 285, 446, 1980)に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

【0066】

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP4もしくはmBSSP4抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP4もしくはmBSSP4抗原を直接または担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP4またはmBSSP4抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP4またはmBSSP4を加え、固相に結合した抗BSSP4モノクロ

ーナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

【0067】

抗hBSSP4もしくはmBSSP4モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP4もしくはmBSSP4抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

【0068】

ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

【0069】

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地(IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

【0070】

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモ

ノクローナル抗体は、本発明における h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号 2 および 4 に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、B S S P 4 ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

【0071】

抗 h B S S P 4 または m B S S P 4 モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えば D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテイン A もしくはプロテイン G 等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを 0.05 ~ 2 % の濃度で添加する。その他、グリシン、 α -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。I g M 抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 β -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

【0072】

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗

体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免役された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0073】

hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP4もしくはmBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を

測定する方法が挙げられる。

【0074】

サンドイッチ法による h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体と h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体－h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

【0075】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0076】

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

【0077】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

【0078】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェ

ニルリン酸等を使用することができ、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセインジー (β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

【0079】

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばFab', Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、hBSSSP4もしくはmBSSSP4またはその断片を含む試料もしくはこれらの前駆体またはその断片を含む試料であれば限定されない。

【0080】

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分を言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言う。

【0081】

配列番号2に示す成熟型hBSSSP4 (アミノ酸番号1~268) のアミノ酸配列はアミノ酸268個から成るhBSSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数804個から成る。本発明者らは本成

熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、h B S S P 4の前駆体と考えられる。

【0082】

配列番号4に示す成熟型h B S S P 4（アミノ酸番号1～270）のアミノ酸配列はアミノ酸270個から成るh B S S 4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数810個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、h B S S P 4の前駆体と考えられる。

【0083】

配列番号6に示す成熟型h B S S P 4（アミノ酸番号1～257）のアミノ酸配列はアミノ酸257個から成るh B S S 4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数771個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、h B S S P 4の前駆体と考えられる。

【0084】

配列番号8に示すh B S S P 4（アミノ酸番号1～97）のアミノ酸配列はアミノ酸97個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数291個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、h B S S P 4の前駆体と考えられる。

【0085】

配列番号10に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～158）のアミノ酸配列はアミノ酸158個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数474個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

【0086】

配列番号12に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～82）のアミノ酸配列はアミノ酸82個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数246個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

【0087】

配列番号14に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～185）のアミノ酸配列はアミノ酸185個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数555個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

【0088】

配列番号16に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～80）のアミノ酸配列はアミノ酸80個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数240個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

【0089】

配列番号18に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～253）のアミノ酸配列はアミノ酸253個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数759個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4

の前駆体と考えられる。

【0090】

配列番号20に示す成熟型mBSSP4（アミノ酸番号1～259）のアミノ酸配列はアミノ酸259個から成るmBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数777個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、mBSSP4の前駆体と考えられる。

【0091】

【実施例】

実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社)を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG, 2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GAに示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5 μ l、10 \times ExTaqバッファを5 μ l、dNTPを5 μ l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製)を0.5 μ l加え滅菌水で全量を50 μ lとし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで35回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット(Invitrogen社)添付のpCRII-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp⁺)プレートに播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー (ABI社)を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクローン、BSSP4遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP4クローン特異的プライマーを作製し、human brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社)

を用いてこの試薬に付属するAP1プライマーとGSP1プライマーで94℃、2分を1サイクル、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、30秒を35サイクルするPCRを行った。次に、このPCR産物を1/100に希釈したものを5μl、10×バッファーを5μl、dNTPを5μl、10μMのGSP2プライマーを10pmol、AP2プライマーを10pmol、ExTaqを0.5ユニット、滅菌水で全量を50μlとし、先と同様にPCRを行った。このPCR産物を上記TOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて下記に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にしてcDNA全長を増幅できるような下記に示すプライマーを作製し、human Marathon ready brain cDNAを鋳型としてPCRを行い同一クローンであることを確認し、これをTOPO TAクローニングキットに添付のpCRII-TOPOベクターにクローニングし、全長のcDNAクローンが入ったプラスミドpCRII/hBSSP4を得た。同様にGSP1、GSP2をmouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社)を鋳型にして5' RACE、3' RACE法を行い、クローニングしてマウスの相同性のある遺伝子pCRII/mBSSP4を得た。

【0092】

human BSSP4	hBSSP4F1	Forward	AGGTTTCCTATCATCGACTCG	RACE
	hBSSP4F2	Forward	TGAGGACATGCTGTGTGCCGG	RACE
	hBSSP4F3	Forward	GTTGTGGGCGGCGAGGACAG	mature
	hBSSP4F6	Forward	GCCATGGTGGTTTCTGGAGC	全長用
	hBSSP4R1	Reverse	TATGGTTTGTTCAGGTTGTCC	RACE
	hBSSP4R2	Reverse	AGGGCAATGTCTGCACAGGC	RACE
	hBSSP4R3/E	Reverse	CTGAATTCCTAGGAGCGCGCGCGGCC	全長用
	hBSSP4R4/E	Reverse	GAGAATTCGATATGTGGGCAGGGTTACA	全長用
mouse BSSP4	mBSSP4.1	Forward	ACAAACCATCTCTGTTCTCAG	RACE
	mBSSP4F2	Forward	GTCCCAGAAAGTAGGCATTG	RACE

mBSSP4F3	Forward	CTCCACCCATACCAGCAATG	全長用
mBSSP4F4	Forward	ATTGTGGGAGGTGAGGACAG	mature
mBSSP4.2	Reverse	TGCAGAGTTCGGAGTCGATG	RACE
mBSSP4R2	Reverse	ATCCAGCAGTCGGTCTTGGG	RACE
mBSSP4R3/P	Reverse	ATTCTGCAGTTCCTTGTCTCTCGCTCAGG	全長用

【0093】

実施例2 hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

Balb/cマウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit(Amersham-Pharmacia)のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターをpCRII/mBSSP4よりmBSSP4の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 α - 32 P dCTPで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot, human multiple tissue blot IIおよびhuman brain multiple blot II (Clontech社製)膜をpCRII/hBSSP4の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 α - 32 P dCTPで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを2×SSC/0.1%SDSで室温30分間、1×SSC/0.1%SDSで室温30分間、0.1×SSC/0.1%SDSで65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート(富士フイルム社)に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot膜(図1)、human multiple tissue blot II膜(図2)、human brain multiple blot II膜(図3)、生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製したmRNA(図4)、生後1、3、12ヶ月のマウスの前立腺から調製したmRNA(図5)を用いた結果を示す。また、上記で作製したmRNAをReady To Go RT-PCR Beads(Amersham-Pharmacia)を用いてキット添付のプロトコル通りにhBSSP4およびmBSSP4について遺伝子特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。ノザン・ブロット解析の場合、図1～3に示すように、hBSSP4は前立腺(図2、1.35～2.4kbの間のバンド)および小脳(図3、

1. 35～2. 4 kbの間のバンド)で発現を示し、mBSSP4は前立腺および骨格筋で発現が認められた。またRT-PCRの結果、hBSSP4は胎児から成人の脳、胎盤、精巣および前立腺で発現が認められ、mBSSP4は新生児から成人マウスの前立腺で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、胎盤、精巣および骨格筋において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。

【0094】

実施例3 hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼの発現

(1) 発現プラスミドの構築

プラスミドpCRII/hBSSP4またはpCRII/mBSSP4をテンプレートに、hBSSP4タンパク質またはmBSSP4タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域をPCR反応にて増幅した。このPCR産物をそれぞれpTrc-HisB(Invitrogen)をBamHIで消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌DH5αを形質転換させ、生じたコロニーをPCR法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミドpTrcHis/hBSSP4およびpTrcHis/mBSSP4を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれE. coli pTrcHis/hBSSP4およびE. coli pTrcHis/mBSSP4と命名し、1998年10月29日より、受託番号FREM P-17037およびFREM P-17034の下、工業技術院生命工学技術研究所に委託してある。

【0095】

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを10mlのLB(Amp+)培地に接種し、一晚37℃で培養した。これを250mlのLB(Amp+)培地に接種し、37℃で培養した。600nmの吸光度が0.5になった時、250μlの0.1M IPTG(イソプロピル-β-D(-)チオガラクトピラノシド)を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊

バッファー（10mMリン酸バッファー pH7.5、1mM EDTA）で懸濁し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファーで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファー（8M Urea、50mM Tris pH8.5、20mM 2ME）で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin（Clontech社製）に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物をPBSで一晩おきにバッファー交換しながら3日間透析し、タンパク質hBSSP4-HisおよびmBSSP4-Hisを得た。

【0096】

実施例4 hBSSP4 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/hBSSP4を用いた発現

（1）pFBTrypSigTag/hBSSP4の作製

配列番号21と22をアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A（Invitrogen社製）に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ（宝酒造）を加えて室温（25℃）で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase（宝酒造）を加えて65℃で30分反応した。

【0097】

特開平9-14790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、pSPORT/ニューロシンをクローニングした。pSPORT/ニューロシンより、配列番号23および24を用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の

3'側のXhoIサイトを10 unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARAライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た(図6)。

【0098】

配列番号25および26によりpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号26および27によって増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した(図7A)。

【0099】

pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号24と28を用いたPCRによって作製したcDNAをBgIIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号24と29を用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。

【0100】

5μgのpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングビーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

【0101】

E. coli pTrcHis/hBSSP4(受託番号FERM P-17037)から得られるpTrcHis/hBSSP4またはpCRII/hBS

SP4より定法に従いPCRを行い、hBSSP4の活性体領域のcDNAを得た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTrypSigTag/hBSSP4を得た(図7B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しくhBSSP6が挿入されているかを確認した。

【0102】

pFBTrypSigTag/hBSSP4をGibco BRL BAC-TO-BAC baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、His tagおよびエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP6を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウイルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

E. coli pTrcHis/mBSSP4(受託番号FERM P-17034)から得られるpTrcHis/mBSSP4またはpCRII/mBSSP4を用いて、上記と同様にpFBTrypSigTag/mBSSP4を作製し、分泌させることができる。

【0103】

酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質hBSSP4をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファーを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾール(和光純薬工業)を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム(Pharmacia社製)でPBSバッファーに交換した。このサンプル50 μ Lにエンテロキナーゼ(1U/1 μ L, Invitrogen社製)10 μ Lを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質(ペプチド研究所)をDMSOに溶解し、1M Tris-HCl, (pH8.0)で希釈した0.2M基質溶液を50 μ L加え、さらに、37 $^{\circ}$ Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC(7-アミノ-4-メチルクマリン)の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

【配列表】

<110> Fuso Yakuhin Kogyo Kabushikigaisya

<120> Novel serine protease BSSP4

<130> 163445

<160> 29

<210> 1

<211> 1282

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc   51
    Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
          -45                -40                -35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc  102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
          -30                -25                -20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt  153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
          -15                -10                -5                -1    1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc  204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
          5                10                15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg  255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

```


20	25	30	35	
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306			
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu				
40	45	50		
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357			
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser				
55	60	65		
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408			
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys				
70	75	80	85	
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459			
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln				
90	95	100		
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510			
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu				
105	110	115	120	
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561			
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly				
125	130	135		
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612			
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile				
140	145	150		
gac tgc gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663			
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro				
155	160	165	170	
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714			
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala				
175	180	185		
tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg	765			

Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp
 190 195 200 205
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg
 210 215 220
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile
 225 230 235
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg
 240 245 250 255
 gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc gcc gcg cgc tcc tagggcgcag cgggacgcgg974
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser
 260 265
 ggctcggatc tgaaaggcgg ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg 1034
 cggtttcccc cgccgtaaat aggctcatct acctctacct ctggggggccc ggacggctgc 1094
 tgcggaaagg aaacccccctc cccgaccgc cgcacggcct caggccccgc cctccaaggc 1154
 atcaggcccc gcccaacggc ctcatgtccc cgccccacg acttcgggcc ccgccccgg 1214
 gccccagcgc ttttgtgtat ataaatgtta atgattttta taggtatttg taaccctgcc 1274
 cacatatc 1282

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys leu Gly

Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg
 210 215 220

Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile
 225 230 235

Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg
 240 245 250 255

Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser
 260 265

<210> 3

<211> 1007

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 865, 866

<223> n is a, c, g or t.

<400> 3

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile	
5 10 15	
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg	255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp	
20 25 30 35	
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu	
40 45 50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser	
55 60 65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys	
70 75 80 85	
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln	
90 95 100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu	
105 110 115 120	
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly	
125 130 135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile	
140 145 150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro	
155 160 165 170	

atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct 714
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala
 175 180 185

tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp
 190 195 200 205

ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg
 210 215 220

ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag nnc 867
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Xaa
 225 230 235

gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg
 240 245 250 255

gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc cca gcg ctt ttg tgt ata taaatgttaa 970
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile
 260 265 270

tgatttttat aggtatttgt aaccctgccc acatatac 1007

<210> 4

<211> 319

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 239

<223> Xaa is an amino acid.

4

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser

Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys

Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln

Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu

Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly

Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile

Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro

Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala

175 180 185

Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp
 190 195 200 205
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg
 210 215 220
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Xaa
 225 230 235
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg
 240 245 250 255
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile
 260 265 270

<210> 5

<211> 1036

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 907

<223> n is a, c, g or t.

<400> 5

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
 Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
 -45 -40 -35
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
 -30 -25 -20
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15	-10	-5	-1	1	
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc	204				
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile					
5	10	15			
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg	255				
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp					
20	25	30	35		
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306				
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu					
40	45	50			
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357				
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser					
55	60	65			
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408				
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys					
70	75	80	85		
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459				
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln					
90	95	100			
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510				
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu					
105	110	115	120		
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561				
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly					
125	130	135			
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612				
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile					
140	145	150			
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663				

Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro
 155 160 165 170
 atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct 714
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala
 175 180 185
 tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp
 190 195 200 205
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg
 210 215 220
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile
 225 230 235
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc ccc cgg gcc cca ncg ctt ttg tgt 918
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Pro Arg Ala Pro Xaa Leu Leu Cys
 240 245 250 255
 ata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt aaccctgccc acatatctta 971
 Ile
 tttattcctc caatttcaat aaattattta ttctccagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1031
 aaaaa 1036

<210> 6

<211> 306

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 253

<223> Xaa is an amino acid.

<400> 6

Met	Val	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Gly
				-45				-40					-35		
Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn	Ala
				-30				-25					-20		
Arg	Ile	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Gln	Leu	Asn	Arg
	-15					-10				-5				-1	1
Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ser	Thr	Asp	Ser	Glu	Trp	Pro	Trp	Ile	Val	Ser
		5						10					15		
Gln	Lys	Asn	Gly	Thr	His	His	Cys	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
	20						25				30				35
Val	Ile	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Lys	Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	Tyr
			40						45					50	
Phe	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Gln	Leu	Gly	Asn	Pro	Gly	Ser	Arg
		55					60					65			
Gln	Lys	Val	Gly	Val	Ala	Trp	Val	Glu	Pro	His	Pro	Val	Tyr	Ser	Trp
	70				75					80					85
Glu	Gly	Ala	Cys	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Arg	Ser	Ile
			90					95					100		
Phe	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Asp	Ala	Ser	Ile	His
	105					110					115				120
Pro	Pro	Asn	Thr	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Asp
				125					130					135	
Val	Pro	Leu	Pro	His	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Lys	Leu	Lys	Val	Pro	Ile
		140						145					150		
Asp	Ser	Glu	Val	Cys	Ser	His	Leu	Tyr	Trp	Arg	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly
															Pro

155	160	165	170
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala			
175	180	185	
Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp			
190	195	200	205
Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg			
210	215	220	
Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile			
225	230	235	
Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Pro Arg Ala Pro Xaa Leu Leu Cys			
240	245	250	255
Ile			

<210> 7

<211> 1232

<212> DNA

<213> human

<400> 7

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc	51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly	
-45 -40 -35	
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc	102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala	
-30 -25 -20	
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt	153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val	
-15 -10 -5 -1 1	
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc	204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile	
5 10 15	
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gga caa cct gaa caa acc ata cct	255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Gln Pro Glu Gln Thr Ile Pro	
20 25 30 35	
gtt ctc tgt gct gct ggg ggc ctg gca gct ggg gaa ccc tgg ctc tcg gtc	306
Val Leu Cys Ala Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Glu Pro Trp Leu Ser Val	
40 45 50	
cca gaa ggt ggg tgt tgc ctg ggt gga gcc cca ccc tgt gta ttc ctg gaa	357
Pro Glu Gly Gly Cys Cys Leu Gly Gly Ala Pro Pro Cys Val Phe Leu Glu	
55 60 65	
gga agg tgc ctg tgc aga cat tgc cct ggt gcg tct cga gcg ctc cat aca	408
Gly Arg Cys Leu Cys Arg His Cys Pro Gly Ala Ser Arg Ala Leu His Thr	
70 75 80 85	
gtt ctc aga gcg ggt cct gcc cat ctg cct acc tgatgcctct atccacctcc	461
Val Leu Arg Ala Gly Pro Ala His Leu Pro Thr	
90 95	
ctccaaacac ccactgctgg atctcaggct gggggagcat ccaagatgga gttcccttgc	521
cccaccctca gaccctgcag aagctgaagg ttccatatcat cgactcgga gtctgcagcc	581
atctgtactg gcggggagca ggacaggac ccatcactga ggacatgctg tgtgccggt	641
acttgagggg ggagcgggat gcttgtctgg gcgactccgg gggccccctc atgtgccagg	701
tggacggcgc ctggctgctg gccggcatca tcagctgggg cgagggtgt gccgagcgca	761
acaggcccgg ggtctacatc agcctctctg cgcaccgctc ctgggtggag aagatcgtgc	821
aaggggtgca gctccgcggg cgcgctcagg ggggtggggc cctcaggga ccgagccagg	881
gctctggggc cgccgcgcgc tcctagggcg cagcgggacg cggggctcgg atctgaaagg	941
cggccagatc cacatctgga tctggatctg cggcggcctc gggcggtttc ccccgccgta	1001
aataggctca tctacctcta cctctggggg cccggacggc tgctgcggaa aggaaacccc	1061
ctccccgacc cgcccgaagg cctcaggccc cgccctccaa ggcatcaggc cccgcccac	1121
ggcctcatgt ccccgcccc acgacttccg gccccgcccc cgggccccag cgcttttgtg	1181

<212> DNA

<213> human

<400> 9

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc  51
    Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
          -45          -40          -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
          -30          -25          -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
          -15          -10          -5          -1   1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
          5          10          15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc 255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr
          20          25          30          35
ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg 306
Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu
          40          45          50
tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc atc act gag gac atg ctg tgt gcc 357
Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala
          55          60          65
ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc 408
Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro
          70          75          80          85
ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg 459

```

Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp
 90 95 100
 ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct 510
 Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser
 105 110 115 120
 gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg 561
 Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly
 125 130 135
 cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc 612
 Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala
 140 145 150
 gcc gcg cgc tcc tagggcgcag cgggacgcgg ggctcggatc tgaaaggcgg 664
 Ala Ala Arg Ser
 155
 ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg cggtttcccc cgccgtaaat 724
 aggctcatct acctctacct ctggggggccc ggacggctgc tgcggaaagg aaacccccctc 784
 cccgacccgc ccgacggcct caggccccgc cctccaaggc atcaggcccc gcccaacggc 844
 ctcatgtccc cgccccacg acttcgggcc ccgccccggg gccccagcgc ttttgtgtat 904
 ataaatgtta atgattttta taggtatttg taaccctgcc cacatatc 952

<210> 10

<211> 207

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30	-25	-20
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val		
-15	-10	-5
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile		
5	10	15
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr		
20	25	30
Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu		
40	45	50
Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala		
55	60	65
Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro		
70	75	80
Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp		
90	95	100
Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser		
105	110	115
Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly		
125	130	135
Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala		
140	145	150
Ala Ala Arg Ser		
155		

<210> 11

<211> 1083

<212> DNA

<213> human

<400> 11

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
      -45              -40              -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
      -30              -25              -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
      -15              -10              -5              -1 1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
      5              10              15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
      20              25              30              35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu
      40              45              50
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser
      55              60              65
cag aag ttc cct tgc ccc acc ctc aga ccc tgc aga agc tgaaggttcc 406
Gln Lys Phe Pro Cys Pro Thr Leu Arg Pro Cys Arg Ser
      70              75              80
tatcatcgac tcggaagtct gcagccatct gtactggcgg ggagcaggac agggacccat 466
cactgaggac atgctgtgtg ccggctactt ggagggggag cgggatgctt gtctgggcga 526
ctccgggggc cccctcatgt gccaggtgga cggcgcctgg ctgctggccg gcatcatcag 586
ctggggcgag ggctgtgccg agcgcaacag gcccggggtc tacatcagcc tcctctgcga 646

```

ccgctcctgg gtggagaaga tcgtgcaagg ggtgcagctc cgcgggcgcg ctcagggggg 706
 tggggccctc agggcaccga gccagggtc tggggccgcc gcgcgctcct agggcgcagc 766
 gggacgcggg gctcggatct gaaaggcggc cagatccaca tctggatctg gatctgcggc 826
 ggcctcgggc gggttcccc gccgtaaata ggctcatcta cctctacctc tgggggccc 886
 gacggctgct gcggaaagga aacccccctc ccgacccgcc cgacggcctc agggccccgcc 946
 ctccaaggca tcaggccccg cccaacggcc tcatgtcccc gccccacga ctccggccc 1006
 cgccccggg cccagcgcgt tttgtgtata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt 1066
 aaccctgccc acatatc 1083

<210> 12

<211> 131

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
 -45 -40 -35
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
 -30 -25 -20
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
 -15 -10 -5 -1 1
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
 5 10 15
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
 20 25 30 35
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu
 40 45 50
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser
 55 60 65

Gln Lys Phe Pro Cys Pro Thr Leu Arg Pro Cys Arg Ser

70

75

80

<210> 13

<211> 723

<212> DNA

<213> human

<400> 13

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

20

25

30

35

gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

40

45

50

ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser

55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408		
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459		
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510		
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561		
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctc tcc aag gca tca ggc ccc gcc caa	612		
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln			
140	145	150	
cgg cct cat gtc ccc gcc ccc acg act tcc ggc ccc gcc ccg ggc ccc agc	663		
Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser			
155	160	165	170
gct ttt gtg tat ata aat gtt aat gat ttt tat agg tat ttg taaccctgcc	715		
Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu			
175	180	185	
cacatatac			723

<210> 14

<211> 234

<212> PRT

<213> human

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
-45 -40 -35
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
-30 -25 -20
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
-15 -10 -5 -1 1
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
5 10 15
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
20 25 30 35
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu
40 45 50
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser
55 60 65
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys
70 75 80 85
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln
90 95 100
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu
105 110 115 120
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly
125 130 135
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln
140 145 150
Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser
155 160 165 170
Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu
175 180 185

<210> 15

<211> 1004

<212> DNA

<213> human

<400> 15

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc  51
    Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
          -45                      -40                      -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
    Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
          -30                      -25                      -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
    Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
          -15                      -10                      -5                      -1    1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
    Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
          5                      10                      15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255
    Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
          20                      25                      30                      35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gat tcc ctt gcc cca ccc tca gac 306
    Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp
          40                      45                      50
cct gca gaa gct gaa ggt tcc tat cat cga ctc gga agt ctg cag cca tct 357
    Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser
          55                      60                      65
gta ctg gcg ggg agc agg aca ggg acc cat cac tgaggacatg ctgtgtgccg  410

```

70	75	80	
gctacttggga	gggggagcgg	gatgcttgtc	tgggcgactc cgggggcccc ctcatgtgcc 470
aggtggacgg	cgccctggctg	ctggccggca	tcatcagctg gggcgagggc tgtgccgagc 530
gcaacaggcc	cggggtctac	atcagcctct	ctgcgcaccg ctccctgggtg gagaagatcg 590
tgcaaggggt	gcagctccgc	gggcgcgctc	aggggggttg ggccctcagg gcaccgagcc 650
agggtctctgg	ggccgcccg	cgctcctagg	gcgcagcggg acgcggggct cggatctgaa 710
aggcgggccag	atccacatct	ggatctggat	ctgcggcggc ctcgggcggt ttccccgcc 770
gtaaataaggc	tcatctacct	ctacctcttg	gggcccggac ggctgctgcg gaaaggaaac 830
cccctccccg	acccgcccga	cggcctcagg	ccccgccctc caaggcatca ggccccgccc 890
aacggcctca	tgtccccgcc	cccacgactt	ccggccccgc ccccgggccc cagcgctttt 950
gtgtatataa	atgttaatga	tttttatagg	tatttgtaac cctgccca tatic 1004

<211> 129

<212> PRT

<213> human

<400> 16

Met	Val	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Gly	
				-45					-40					-35		
Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn	Ala	Ala
			-30					-25					-20			
Arg	Ile	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Gln	Leu	Asn	Arg	Val
	-15					-10					-5				-1	1
Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ser	Thr	Asp	Ser	Glu	Trp	Pro	Trp	Ile	Val	Ser	Ile
			5						10					15		
Gln	Lys	Asn	Gly	Thr	His	His	Cys	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Trp
	20						25				30					35

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp

40

45

50

Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser

55

60

65

Val Leu Ala Gly Ser Arg Thr Gly Thr His His

70

75

80

<210> 17

<211> 948

<212> DNA

<213> human

<400> 17

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

20

25

30

35

gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306

Val	Ile	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Lys	Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	Tyr	Leu			
				40					45					50					
ttc	tct	gtg	ctg	ctg	ggg	gcc	tgg	cag	ctg	ggg	aac	cct	ggc	tct	cgg	tcc	357		
Phe	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Gln	Leu	Gly	Asn	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser			
		55					60					65							
cag	aaa	gtg	ggt	gtt	gcc	tgg	gtg	gag	ccc	cac	cct	gtg	tat	tcc	tgg	aag	408		
Gln	Lys	Val	Gly	Val	Ala	Trp	Val	Glu	Pro	His	Pro	Val	Tyr	Ser	Trp	Lys			
70					75				80					85					
gaa	ggt	gcc	tgt	gca	gac	att	gcc	ctg	gtg	cgt	ctc	gag	cgc	tcc	ata	cag	459		
Glu	Gly	Ala	Cys	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Arg	Ser	Ile	Gln			
		90					95					100							
ttc	tca	gag	cgg	gtc	ctg	ccc	atc	tgc	cta	cct	gat	gcc	tct	atc	cac	ctc	510		
Phe	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Leu			
105					110				115					120					
cct	cca	aac	acc	cac	tgc	tgg	atc	tca	ggc	tgg	ggg	agc	atc	caa	gat	gga	561		
Pro	Pro	Asn	Thr	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Asp	Gly			
				125				130					135						
gtt	ccc	ttg	ccc	cac	cct	cag	acc	ctg	cag	aag	ctg	aag	gtt	cct	atc	atc	612		
Val	Pro	Leu	Pro	His	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Lys	Leu	Lys	Val	Pro	Ile	Ile			
		140					145					150							
gac	tgc	gaa	gtc	tgc	agc	cat	ctg	tac	tgg	cgg	gga	gca	gga	cag	gga	ccc	663		
Asp	Ser	Glu	Val	Cys	Ser	His	Leu	Tyr	Trp	Arg	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Pro			
155				160				165					170						
atc	act	gag	gac	atg	ctg	tgt	gcc	ggc	tac	ttg	gag	ggg	gag	cgg	gat	gct	714		
Ile	Thr	Glu	Asp	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Ala			
		175					180					185							
tgt	ctg	gtg	agc	tcc	ctc	gag	ccc	ccc	acc	cct	ggc	cag	gag	ggc	ctc	ggg	765		
Cys	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Gly	Gln	Glu	Gly	Leu	Gly			
190					195				200				205						

aag gag cca gcg tca gtc ctg tcc cca ctg agc ccc aca acc tct ccc tgg 816
 Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp
 210 215 220
 cct cct ccc cag aac tgg ctg tgc ctg aca gtc ccg ggt ccc cat aga acc 867
 Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr
 225 230 235
 agc ctc agc ctg gct cag cca ctc act tat ttg ttc aga cat taaactgggc 919
 Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His
 240 245 250
 atcccagctg caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 948

<210> 18

<211> 302

<212> PRT

<213> human

<400> 18

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
 -45 -40 -35
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
 -30 -25 -20
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
 -15 -10 -5 -1 1
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
 5 10 15
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
 20 25 30 35
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu
 40 45 50

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala			
175	180	185	
Cys Leu Val Ser Ser Leu Glu Pro Pro Thr Pro Gly Gln Glu Gly Leu Gly			
190	195	200	205
Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp			
210	215	220	
Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr			
225	230	235	
Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His			
240	245	250	

<210> 19

<211> 1322

<212> DNA

<213> mouse

<400> 19

cctgccagtc tcaagcaaca cagcccttag gtcctttgag ccggccagca gccttgctgg	60		
gtctccaccc ataccagca atg atg atc tcc aga cct ccc cca gca ctg ggt	112		
Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly			
-45	-40		
ggg gac cag ttc agc atc tta atc ctt ctg gtg ctg ctg act tcc aca gct	163		
Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Leu Val Leu Leu Thr Ser Thr Ala			
-35	-30	-25	
ccc atc agt gct gcc acc atc cga gtg tcc cca gac tgt ggg aag cct cag	214		
Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln			
-20	-15	-10	-5
cag ctg aac cgg att gtg gga ggt gag gac agc atg gat gcc cag tgg ccc	265		
Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro			
-1	1	5	10
tgg att gtt agc atc ctc aag aat ggc tcc cac cac tgt gca ggc tcc ctg	316		
Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu			
15	20	25	30
ctc acc aac cgc tgg gtg gtc aca gcc gcg cac tgc ttt aag agc aat atg	367		
Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met			
35	40	45	
gac aaa cca tct ctg ttc tca gta ttg ttg ggg gcc tgg aag ctg ggg agc	418		
Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser			
50	55	60	
cca ggc cca agg tcc cag aaa gta ggc att gct tgg gtg ctg cct cac ccc	469		
Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro			
65	70	75	80
agg tat tct tgg aag gag gga acc cat gca gac att gcc ctg gtg cgc ctg	520		
Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu			

85	90	95	
gaa cac tcc atc cag ttc tct gag cgg atc ctg ccc atc tgc cta cct gac			571
Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp			
100	105	110	115
tcc tct gtc cgt ctc cct ccc aag acc gac tgc tgg att gcc ggc tgg gga			622
Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly			
120	125	130	
agc atc cag gat gga gtg ccc ctg ccc cac cct cag acc ctt cag aag ctg			673
Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu			
135	140	145	
aag gtg ccc atc atc gac tcc gaa ctc tgc aaa agc ttg tac tgg cgg gga			724
Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly			
150	155	160	165
gcc ggt cag gaa gcc atc acg gag ggc atg ctg tgt gct ggt tac ctg gaa			775
Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu			
170	175	180	
ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tct ggg ggt ccc ctg atg tgc cag			826
Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln			
185	190	195	200
gtg gat gac cac tgg cta ctg act ggc ata atc agc tgg gga gag ggc tgc			877
Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys			
205	210	215	
gga gcg caa ccg gcc cgg tgt gta cac cag cct cct agc tca ccg ctc ctg			928
Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu			
220	225	230	
ggt gca aag gat cgt tca agg ggt gca gct gcg cgg gta ctt ggc gga cag			979
Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln			
235	240	245	250
tgg gga cac agg aag ctc cta atc taggatctga agatgagcag cctcctgcaa			1033

Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile

255

tctctctgc tgtaaata	tgttctacct ccggggggcg	cccgcggcct gagcgagaga	1093
acaaggaagt tctggaaccg	cccacataga ggatccgccc	ctcaatcgag gactctgtgt	1153
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt	gtgtgtgcct ctgtgtgcgt	gtgtatgcgc gcgcacgtgc	1213
gcgcgagagc aatgattttt	ttttttacag ttatacgtaa	ccatgcccac atattttattc	1273
cagtttcaat aaattattta	ttctttaaaaa aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1322

<210> 20

<211> 308

<212> PRT

<213> mouse

<400> 20

Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly

-45

-40

Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Leu Val Leu Leu Thr Ser Thr Ala

-35

-30

-25

Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln

-20

-15

-10

-5

Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro

-1 1

5

10

Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu

15

20

25

30

Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met

35

40

45

Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser

50

55

60

Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro

65	70	75	80
Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu			
85	90	95	
Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp			
100	105	110	115
Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly			
120	125	130	
Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu			
135	140	145	
Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly			
150	155	160	165
Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu			
170	175	180	
Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln			
185	190	195	200
Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys			
205	210	215	
Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu			
220	225	230	
Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln			
235	240	245	250
Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile			
255			

<210> 21

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 21

AAG CTT GGC TAG CAA CAC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CCT TAC CTT TGT TGC	51
TGC TGC TGT TGC TGC CCC CTT TGA CGA CGA TGA CAA GGA TCC GAA TTC	99

<210> 22

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 22

GAA TTC GGA TCC TTG TCA TCG TCG TCA AAG GGG GCA GCA ACA GCA GCA GCA	51
ACA AAG GTA AGG ATC AGG AGT AGA TTC ATG GTG TTG CTA GCC AAG CTT	99

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 23

TTG GTG CAT GGC GGA	15
---------------------	----

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 24

TCC TCG AGA CTT GGC CTG AAT GGT TTT

27

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 25

GCG CTA GCA GAT CTC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CC

35

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 26

TGA AGC TTG CCA TGG ACC AAC TTG TCA TC

29

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 27

CCA AGC TTC ACC ATC ACC ATC ACC AT

26

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 28

GCA CAG TCG AGG CTG AT

17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 29

CAA ATG TGG TAT GGC TG

17

【図面の簡単な説明】

【図1】 human multiple tissue blot膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図2】 human multiple tissue blot II膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図3】 human brain multiple blot II膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図4】 実施例2において調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す。

【図5】 実施例2において調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す。

【図6】 実施例4の方法により構築したプラスミド。

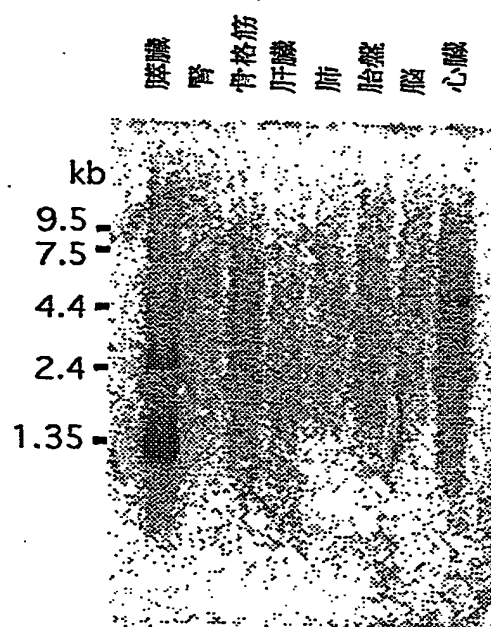
【図7】 実施例4の方法によるプラスミドの構築図。

【書類名】

図面

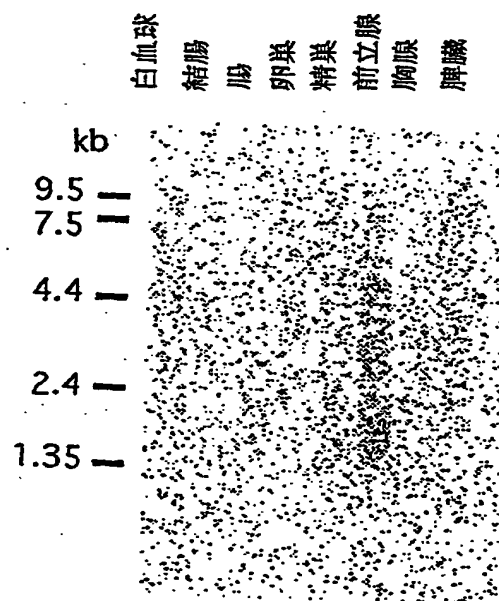
【図 1】

hBSSP-4



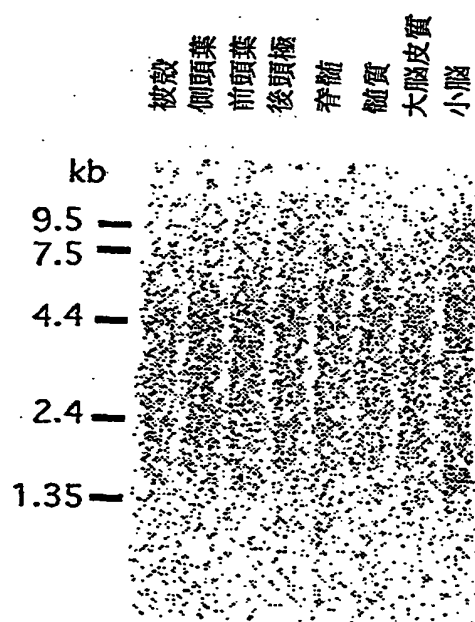
【図2】

hBSSP-4

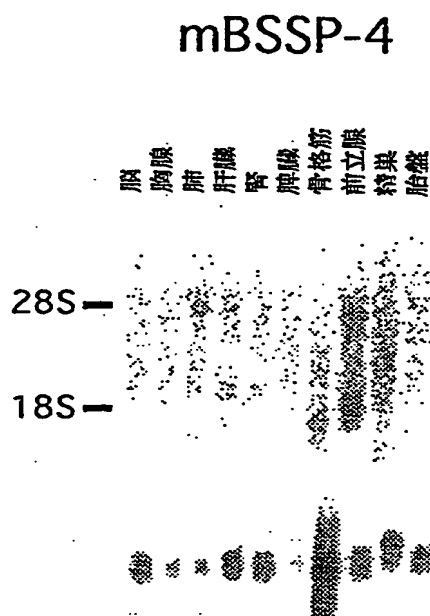


【図3】

hBSSP-4



【図 4】



【図5】

mBSSP-4

前立腺

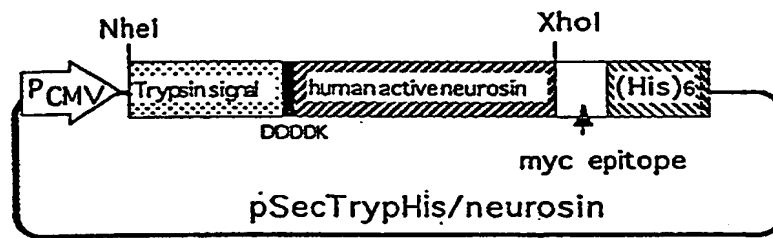
1月3月12月

28S—

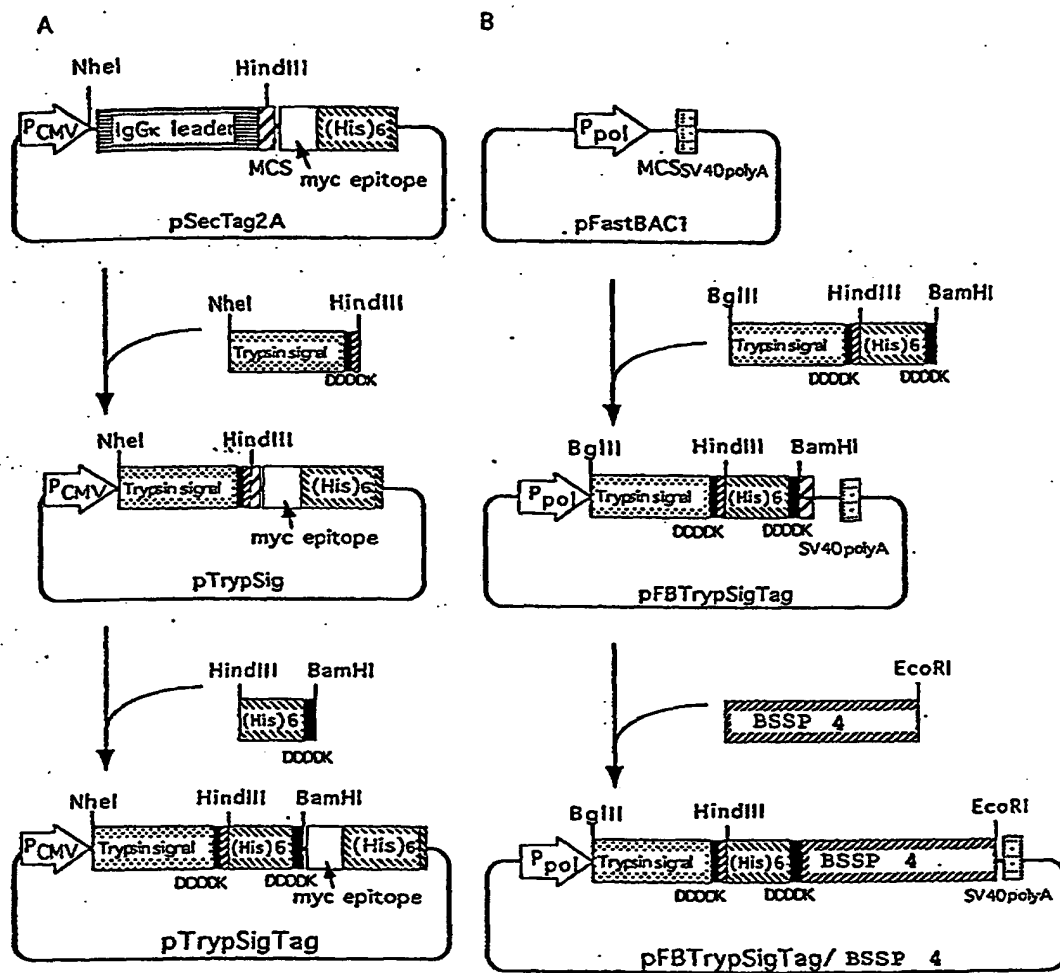
18S—



【図 6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼ (BSSP4) を提供する。

【解決手段】 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 および 20 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP4 の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP4 に対する抗体、該抗体を用いる検体中の BSSP4 の検出方法を提供する。

【選択図】 なし



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1372号

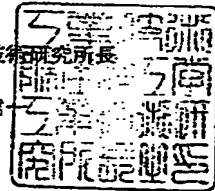
通知年月日: 平成 10 年 10 月 29 日

扶桑薬品工業株式会社
取締役社長 戸田 幹雄

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 署 信



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p>E. coli pTrcHis/mBSSP4</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 17034</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 桶の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p>■ 科学的性質</p> <p>■ 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 10 年 10 月 29 日に受領した1桶の微生物を受託する。</p>	



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生奇文 第 1375号

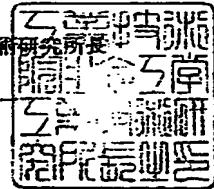
通知年月日: 平成 10 年 10 月 29 日

扶桑薬品工業株式会社
取締役社長 戸田 幹雄

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 著 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) E. coli pTrcHis/h3SSP4	(受託番号) FERM P- 17037
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
■ 科学的性質	
■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 10 年 10 月 29 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000238201
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100062144
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】 青山 葆
【選任した代理人】
【識別番号】 100081422
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所
【氏名又は名称】 田中 光雄
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 受託証 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000238201]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名 扶桑薬品工業株式会社